



PCT/FR00/02336

10-04998

REC'D 03 OCT 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

4

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

11 SEP. 2000

Fait à Paris, le

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

SIEGE
INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
 75800 PARIS Cedex 08
 Téléphone : 01 53 04 53 04
 Télécopie : 01 42 93 59 30

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réserve à l'INPI

BREVET D'INVENTION, CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle-Livre VI

N° 55 -1328

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

Cet imprimé est à remplir en lettres capitales

DB 540a W/170299

DATE DE REMISE DES PIÈCES

19 AOUT 1999

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9910626

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

75 INPI PARIS

DATE DE DÉPÔT

19 AOUT 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADDRESSEÉE

CABINET ORES
6 Avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE

n° du pouvoir permanent	références du correspondant	téléphone
CA644/46FR		

date

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

brevet d'invention demande divisionnaire
 certificat d'utilité transformation d'une demande de brevet européen
 brevet d'invention certificat d'utilité n°

demande initiale

brevet d'invention

Etablissement du rapport de recherche

différé immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

oui non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE COUPLAGE, EN PHASE HOMOGENE, ENTRE UN PEPTIDE ET AU MOINS UN AUTRE COMPOSE ET SES APPLICATIONS

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

code APE-NAF

Forme juridique

1) INSTITUT PASTEUR DE LILLE

Etablissement public

2) CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE-CNRS

Etablissement public

Nationalité (s) 1) 2) française

Adresse (s) complète (s)

Pays

1) 1 rue du Professeur Calmette
BP 245
59019 LILLE CEDEX

FRANCE

2) 3 rue Michel-Ange
75794 PARIS CEDEX 16

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

oui

non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

requise pour la 1ère fois

requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
(nom et qualité du signataire)

VIALLE-PRESLES Marie-José
(n° 93-2009)

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

**BREVET D'INVENTION,
CERTIFICAT D'ÉLÉGÉTÉ**

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

N ° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

99 10 626

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE COUPLAGE, EN PHASE HOMOGENE, ENTRE UN PEPTIDE ET AU MOINS UN AUTRE COMPOSE ET SES APPLICATIONS.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

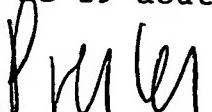
CABINET ORES
6 Avenue de Messine
75008 PARIS
FRANCE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique)

- 1) BONNET Dominique
83 avenue Marx Dormoy
59000 LILLE
- 2) MELNYK Oleg
9 rue Gabriel Péri
59370 MONS EN BAROEUL
- 3) GRAS-MASSE Hélène
321, la Rosière
59710 MERIGNIES

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur(s) ou du mandataire Paris, le 19 août 1999


VIALLE-PRESLES Marie-José
(n° 93-2009)

PROCEDE DE COUPLAGE, EN PHASE HOMOGENE, ENTRE UN PEPTIDE ET AU MOINS UN AUTRE COMPOSE ET SES APPLICATIONS.

La présente invention est relative à un procédé de couplage en phase homogène entre un peptide et au moins un composé portant une fonction acide carboxylique ou alcool, tel qu'un lipide, un sucre, un alcool ou un marqueur de fluorescence, ainsi qu'à des peptides modifiés qui sont essentiellement constitués d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé tel que défini ci-dessus.

La présente invention est également relative à l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique pour fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique.

Le problème de l'entrée dans les cellules vivantes de différentes substances dotées de propriétés pharmacologiques revêt une grande importance sur le plan thérapeutique. Les peptides synthétiques et les oligonucléotides traversent difficilement la membrane cellulaire. Une approche intéressante pour améliorer leur capacité à pénétrer dans la cellule est de les modifier par une partie lipophile. Ainsi, il a été montré qu'un peptide modifié par une simple chaîne aliphatique est capable de pénétrer au sein de la cellule par transfert passif au travers de la membrane et d'interagir avec sa cible intracytoplasmique. Les lipopeptides représentent donc des molécules intéressantes pour vectoriser un motif fonctionnel au sein de la cellule.

La synthèse de lipopeptides peut être réalisée, par exemple, en couplant un acide gras à un peptide en phase solide. En fin de synthèse, des étapes de clavage de la liaison peptide/support solide et de déprotection des chaînes latérales du peptide par un acide fort doivent être réalisées. Ce traitement limite de façon importante le choix de la partie lipophile ; il interdit notamment l'utilisation d'acides gras insaturés. En outre, la purification des lipopeptides par chromatographie liquide haute performance en phase inverse est difficile et conduit à des rendements faibles, eu égard aux nombreuses impuretés qui sont présentes en fin de synthèse.

Il a également été proposé de coupler, en phase homogène, une protéine à un groupement palmitoyl-coenzyme A, ce dernier étant introduit au niveau du groupement thiol d'une cystéine. Un tel couplage se traduit par la formation d'un lien thioester, qui présente l'inconvénient d'être peu stable. D'autre part, cette stratégie est limitée à la modification de certaines protéines par le palmitoyl-coenzyme A et ne peut pas être généralisée à la synthèse de lipopeptides.

Les stratégies actuelles pour la synthèse de lipopeptides consistent également à mettre en oeuvre des réactions de ligation chimique. La ligation chimique

permet de lier, en phase homogène et dans des conditions extrêmement douces, deux structures peptidiques préalablement purifiées et totalement déprotégées.

- Il a ainsi été proposé de lier, dans un tampon aqueux, un acide gras à un peptide par un lien disulfure. Cependant, le lien disulfure pose de nombreux problèmes ; un tel lien est en effet peu stable et susceptible d'être dégradé en présence de thiols, d'où la nécessité d'éviter la contamination des solvants utilisés pour la solubilisation des produits par des thiols, ainsi que l'impossibilité d'introduire une cystéine dans la séquence peptidique à vectoriser. L'utilisation de la chimie des thiols nécessite, en outre, de travailler sous atmosphère inerte dans le but d'éviter l'oxydation des thiols.

- W. ZENG *et al.* (*J. Pept. Sc.*, 1996, 2, 66-72) ont également proposé de lier, en phase homogène, un peptide totalement déprotégé et préalablement purifié à une structure lipidique polyfonctionnelle liée à un peptide, et ce par le biais d'un lien oxime. La partie lipophile est introduite sur une séquence peptidique en phase solide, une telle méthode présentant les inconvénients mentionnés ci-dessus, à savoir la limitation au niveau du choix de la partie lipophile et les difficultés liées à la purification de la structure lipidique.

- De façon similaire, O. MELNYK *et al.* (*J. Peptide Res.*, 1998, 52, 180-184) ont décrit la ligation, en phase homogène et par un lien hydrazone, entre un aldéhyde lipophile de nature peptidique et un autre peptide modifié au niveau de la chaîne latérale de lysine par un groupement hydrazino. Le lien hydrazone est réalisé en phase homogène, mais l'aldéhyde lipophile est synthétisé en phase solide et les limitations sont identiques à celles évoquées précédemment. De plus, le lien hydrazone est sensible aux conditions acides.

- La ligation chimique apparaît comme une méthode de choix pour la synthèse de lipopeptides permettant l'amélioration des rendements d'obtention de ces composés. Cependant, nous avons vu qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de méthodes de ligation n'utilisant pas la chimie des thiols et permettant un couplage direct d'un composé lipophile, non lié à une structure porteuse, à un peptide totalement déprotégé.

Les Inventeurs se sont donc donnés pour but de pourvoir à une nouvelle stratégie de synthèse de lipopeptides et, de façon générale, de peptides modifiés par différents composés de nature lipidique ou autre, par ligation chimique en milieu homogène.

- Cette nouvelle stratégie de synthèse doit notamment répondre aux critères suivants :

- le couplage du composé sus-mentionné, par exemple un lipide, au peptide s'effectue en phase homogène,

- le couplage s'effectue à partir d'un peptide totalement déprotégé, la réaction étant chimiosélective,

5 - les conditions réactionnelles du couplage permettent l'utilisation directe d'acides gras et de dérivés du cholestérol commerciaux,

- les conditions réactionnelles du couplage permettent notamment l'introduction, sur le peptide, d'acides carboxyliques et d'alcools sensibles, comme par exemple des acides gras complexes mono- et polyinsaturés et des dérivés du 10 cholestérol,

15 - le lien formé au cours du couplage est très stable dans une large gamme de pH.

Les Inventeurs se sont également donnés pour but de pourvoir à des peptides modifiés, susceptibles d'être obtenus par ligation chimique, dans lesquels

15 lesdits peptides sont liés à différents composés, notamment à des lipides, par un lien très stable et qui ne présentent pas les inconvénients des liens disulfures de l'Art antérieur.

20 Ces buts sont atteints par la création d'un lien hydrazide entre le peptide et le composé qui lui est couplé, lors d'une synthèse convergente en phase homogène.

La présente invention a pour objet un procédé de couplage entre un peptide et au moins un composé A, de nature non peptidique, portant une fonction sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool, caractérisé en ce que ledit couplage comprend au moins une étape de 25 réalisation, en phase homogène, d'un lien hydrazide entre ledit peptide et ledit composé A.

Au sens de la présente invention, on entend par "peptide" tout enchaînement de plusieurs acides aminés, quels que soient leur nature et leur nombre ; le terme "peptide" désigne donc aussi bien des oligopeptides (dipeptides ou 30 tripeptides) que des polypeptides ou des protéines. On entend également par "lien hydrazide" une liaison covalente comprenant le motif -CO-NH-NH-.

De façon particulièrement avantageuse, le procédé selon l'invention, réalisé en phase homogène, permet d'éviter une étape de clivage du peptide modifié obtenu du support, clivage dont nous avons vu précédemment qu'il limite de façon 35 importante le choix du composé couplé audit peptide. En outre, le lien hydrazide

réalisé entre le peptide et le (ou les) composé(s) A est très stable, et ce dans une gamme de pH très large, et *in vivo*.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon la présente invention, ce dernier comprend, pour réaliser ledit lien

5 hydrazide, les étapes suivantes :

a) activation de la fonction portée par ledit composé A en une fonction réactive correspondante, respectivement sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions ester et les fonctions carbonate, lorsque le composé A porte respectivement une fonction acide carboxylique et une fonction alcool ; et

10 b) réaction, en phase homogène et à un pH inférieur à 6, entre ledit composé A activé obtenu en a) et un peptide, totalement déprotégé, portant un groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine soit au niveau de son extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

15 Au sens de la présente invention, on entend par "groupement hydrazine" ou "groupement dérivé d'hydrazine" tout groupement comprenant le motif -NH-NH₂.

20 Un groupement hydrazine peut être introduit, soit au niveau de l'extrémité N-terminale du peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, par tout moyen connu de l'Homme de l'Art, par exemple selon un protocole de N-amination tel que décrit par C. KLINGUER *et al.* dans Tetrahedron Letters, 1996, 37, 40, 7259-7262.

De façon particulièrement avantageuse, la réaction entre ledit 25 composé A activé et ledit peptide totalement déprotégé, fonctionnalisé tel que décrit ci-dessus, permet d'éviter toute étape de déprotection des chaînes latérales du peptide avec un acide fort, étape dont nous avons vu précédemment qu'elle limite de façon importante le choix du composé couplé audit peptide. Ainsi, la réaction entre ledit composé A activé et ledit peptide totalement déprotégé, fonctionnalisé tel que décrit 30 ci-dessus, permet d'obtenir directement le peptide modifié, c'est-à-dire le peptide couplé au composé A.

Le procédé selon l'invention permet de réaliser une réaction chimiosélective entre le groupement fonctionnel (groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine) introduit sur le peptide et le (ou les) composé(s) A activés ; en effet, la 35 réaction s'effectue à un pH inférieur à 6, pH tel que les fonctions amines des chaînes latérales des lysines (fonction ε-NH₂) ou des ornithines (fonction δ-NH₂) ou la

fonction α -NH₂, N-terminale éventuellement présentes au sein de la séquence peptidique sont protonnées et donc peu réactives. Le contrôle du pH permet donc d'acyler préférentiellement le groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine introduit sur le peptide, sans que les autres groupements fonctionnels des chaînes latérales des 5 acides aminés constitutifs du peptide réagissent.

La réaction de couplage réalisée au cours du procédé selon la présente invention (étape b) s'effectue dans des conditions opératoires très douces et, de façon particulièrement avantageuse, ne nécessite pas de travailler dans des 10 conditions inertes, comme c'est le cas pour certains des procédés de l'Art antérieur, notamment ceux qui consistent à coupler un peptide à un acide gras par un lien disulfure.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, ledit procédé comprend, en outre, une étape c) de 15 purification du peptide modifié obtenu à l'étape b).

Une telle purification est, de façon classique, réalisée par chromatographie liquide haute performance. En comparaison à la purification d'un peptide modifié obtenu par un procédé de couplage réalisé en phase solide, tel que décrit précédemment, la purification du peptide modifié obtenu par le procédé de 20 couplage conforme à la présente invention conduit à des rendements bien meilleurs, le peptide modifié obtenu à l'étape b) étant plus pur qu'un peptide modifié obtenu en phase solide.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, après l'étape a) d'activation de la fonction portée par le composé A, la fonction réactive correspondante portée par le composé A est 25 sélectionnée dans le groupe constitué par les esters et les carbonates de succinimidyle, de sulfosuccinimidyle et d'aryle.

A titre d'exemple d'esters et de carbonates d'aryle, on peut citer les esters et les carbonates de para-nitrophényle.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de 30 couplage selon l'invention, ledit groupement dérivé d'hydrazine portée par le peptide est un groupement α -hydrazinoacétique.

Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, préalablement à l'étape b) du procédé selon l'invention, ledit peptide est fonctionnalisé par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de son 35 extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine

ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, à l'aide de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique.

Selon une modalité préférée de cette disposition, la fonctionnalisation dudit peptide par un groupement α -hydrazinoacétique, grâce à

5 l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique, est suivie d'une étape de purification dudit peptide fonctionnalisé par chromatographie liquide haute performance, à l'aide d'un éluant constitué d'un mélange eau/alcool, de préférence un mélange eau/isopropanol, comprenant de l'acide trifluoroacétique. Un tel éluant permet avantageusement d'éviter toute dégradation du groupement α -hydrazinoacétique porté par le peptide.

10 Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux du procédé de couplage selon l'invention, ledit composé A est sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

A titre d'exemple de marqueur de fluorescence utilisable, on peut citer, de façon non limitative, la fluorescéine ou la rhodamine.

15 Selon une disposition préférée de ce mode de mise en oeuvre, lesdits lipides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols. En effet, le procédé selon l'invention permet avantageusement de coupler à un peptide des acides gras complexes (mono- et polyinsaturés) et, de manière générale, tout acide carboxylique sensible. De 20 préférence, les lipides sus-mentionnés sont sélectionnés dans le groupe constitué par l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide cis-9,10-époxystéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

La présente invention a également pour objet un peptide modifié essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un 25 composé A portant, avant sa liaison audit peptide, une fonction sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool.

30 Selon un mode de réalisation avantageux, le peptide modifié selon la présente invention est essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

Selon une disposition préférée de ce mode de réalisation, le peptide modifié selon la présente invention est un oligopeptide essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide sélectionné dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols.

35 De préférence, ledit oligopeptide selon l'invention est essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide

sélectionné dans le groupe constitué par l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide cis-9,10-époxytéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

La stabilité du lien hydrazide rend les peptides modifiés selon l'invention particulièrement intéressants, puisque le lien hydrazide est stable aussi bien *in vivo* que dans une gamme de pH très large. En outre, le lien hydrazide est stable dans des conditions d'hydrogénéation catalytique, ce qui permet, par exemple dans le cas de peptides modifiés par des acides gras insaturés, la synthèse de lipopeptides marqués au tritium au niveau de la chaîne grasse, utiles pour un suivi radioactif intracellulaire desdits lipopeptides et une meilleure compréhension de leur mécanisme d'action.

La présente invention a également pour objet un vaccin synthétique et un réactif de diagnostic qui comprennent au moins un peptide modifié selon la présente invention, tel que décrit ci-dessus.

~~La présente invention a également pour objet l'utilisation du procédé de couplage conforme à l'invention, tel que décrit ci-dessus, pour la préparation d'un médicament comprenant un principe actif de nature peptidique vectorisé, utile pour le ciblage cellulaire.~~

La présente invention a, en outre, pour objet l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique pour fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de l'extrémité N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

Il est bien entendu, toutefois, qu'un groupement α -hydrazinoacétique peut être introduit sur ledit peptide, soit au niveau de l'extrémité N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, par tout procédé connu de l'Homme de l'Art ; par exemple, la fonctionnalisation d'un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique peut être réalisée par une réaction de N-amination en phase solide, telle que décrite par C. KLINGUER *et al.* dans Tetrahedron Letters, 1996, 37, 40, 7259-7262, au moyen du réactif commercial N-Boc-3-(4-cyanophényl)oxaziridine (BCPO). C'est le cas, par exemple, d'une réaction de N-amination effectuée au niveau d'un résidu glycine situé en position N-terminale d'un peptide ou au niveau de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.

Toutefois, étant donné le coût élevé du BCPO et le temps très important requis pour une telle réaction, cette voie de synthèse n'est adaptée qu'à la

fonctionnalisation de produits à haute valeur ajoutée, synthétisés en faible quantité. De façon particulièrement avantageuse, l'utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)-hydrazinoacétique selon la présente invention est plus simple et bien moins coûteuse pour fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique. Cette fonctionnalisation est effectuée en phase solide, le peptide fonctionnalisé étant ensuite séparé du support solide et déprotégé selon des méthodes connues de l'Homme de l'Art ; une étape de purification par chromatographie liquide haute performance peut ensuite être effectuée, en utilisant l'éluant eau/alcool tel que décrit précédemment, qui permet avantageusement d'éviter toute dégradation du groupement α -hydrazinoacétique porté par le peptide.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention et de synthèses de peptides modifiés selon la présente invention, ainsi qu'aux dessins annexés, dans lesquels :

- la figure 1 illustre la synthèse de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazino-acétique 4 ;
- la figure 2 illustre la synthèse d'un hydrazinopeptide 6 à partir d'un peptide 5 et de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique ;
- la figure 3 illustre la synthèse des lipopeptides 11, 12, 13, 14, 16 et 18 selon le procédé conforme à la présente invention, à partir de l'hydrazinopeptide 6 et des lipides 7, 8, 9, 10, 15 et 17, Su représentant un groupe succinimidyle ;
- la figure 4 illustre la synthèse du lipopeptide 13 par hydrogénéation catalytique du lipopeptide 12 ;
- la figure 5 illustre la synthèse du lipopeptide 21 selon le procédé conforme à la présente invention ;
- la figure 6 illustre la synthèse des lipopeptides 23 et 24 selon le procédé conforme à la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

Dans les exemples qui suivent, les abréviations suivantes sont utilisées : eq. : équivalents ; Boc : *tert*-butyloxycarbonyl ; Boc₂O : éther de di(*tert*-butyloxycarbonyl) ; CH₂Cl₂ : dichlorométhane ; AcOH : acide acétique ; AcOEt : acétate d'éthyle ; Na₂SO₄ : sulfate de sodium ; KH₂PO₄ : dihydrogénophosphate de potassium ; Na₂HPO₄ : phosphate de disodium ; DMF : diméthylformamide ; DMAP :

4-diméthyl-aminopyridine ; PEG : polyéthylèneglycol ; PS : polystyrène ; CDCl₃ : chloroforme deutéré ; CD₃CO₂H : acide acétique d₃ ; TFA : acide trifluoroacétique ; Et₂O : diéthyléther ; THF : tétrahydrofurane ; HBTU : N-oxyde d'hexafluorophosphate de N-[(1H-benzotriazol-1-yl) (diméthylamino) méthylène]-N-méthylméthanaminium ; HOEt : N-hydroxy-benzotriazole ; 'Bu : *tert*-butyl ; DIEA : diisopropyléthylamine ; Pmc : 2,2,5,7,8-pentaméthylchroman-6-sulphonyle ; Trt : trityle ; Fmoc : 9-fluorénylemethoxy-carbonyle ; Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyldihydrobenzofurane-5-sulfonyle ; BOP : benzotriazole-1-yl-oxy-tris(diméthylamino)-phosphoniumhexafluorophosphate ; HPLC : chromatographie liquide haute performance ; RP-HPLC : chromatographie liquide haute performance en phase inverse ; ES-MS : spectrométrie de masse par électronébulisation ; TOF : time-of-flight ; MALDI : matrix-assisted laser desorption ionisation ; RMN : résonance magnétique nucléaire ; TOCSY : total correlation spectroscopy ; PDMS : Spectrométrie de Masse à Désorption de Plasma ; PAL : peptide-amide linker.

15 **EXEMPLE 1 : Synthèse de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4 (figure 1).**

1) Synthèse du N-Boc hydrazinoacétate d'éthyle 2

1.99 g (12.8 mmoles) d'hydrazinoacétate d'éthyle commercial 1 et 3.14 g (14.4 mmoles) de Boc₂O sont dissous dans 13 ml d'un mélange eau/éthanol (1/1). Après dissolution des réactifs, 1.58 ml de N-méthylmorpholine (14.4 mmoles) sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 2h d'agitation à température ambiante, le mélange est dilué dans 50 ml d'eau. La phase aqueuse est saturée avec du KH₂PO₄, puis extraite avec de l'éther de pétrole (2 x 30 ml) et du diéthyléther (3 x 30 ml). Les phases organiques sont réunies puis séchées sur sulfate de sodium et enfin concentrées sous pression réduite. Le produit obtenu 2 est une huile jaune (2.66 mg, 12 mmoles, rendement : 93,7%), utilisée sans autre forme de purification dans la suite de la synthèse. L'analyse du produit 2 par RMN est la suivante : RMN ¹H (CDCl₃, réf TMS, 323 K) δ : 4.19 (q, 2H, J=7 Hz), 4.11 (s, 2H), 1.45 (m, 9H), 1.26 (t, 3H, J=7.16 Hz).

2) Synthèse du N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétate d'éthyle 3

Le composé 2 (3.26 g, 14.9 mmoles) est dissous dans 3 ml de CH₂Cl₂ en présence de 4.36 ml de Et₃N (31.29 mmoles) à 0°C. Par ailleurs, 6.83 g (31.29 mmoles) de Boc₂O sont dissous dans 5ml de CH₂Cl₂ en présence de 546 mg (4.47 mmoles) de DMAP à 0°C. Après dissolution totale des réactifs, le mélange composé 2 / Et₃N est additionné gouttes à gouttes au mélange Boc₂O / DMAP. Une fois l'addition terminée, la température du milieu réactionnel est progressivement ramenée à température ambiante. Après 2h d'agitation, le milieu est dilué avec 10 ml de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec une solution saturée en KH₂PO₄, séchée

sur sulfate de sodium puis distillée sous pression réduite. L'huile jaune-orangé résiduelle est purifiée par chromatographie sur silice (40-60 microns) avec un mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2 / \text{AcOEt}$ (97 : 3). Le produit obtenu 3 est une huile jaune (3.0 g, 7.2 mmoles, rendement : 48%). Son analyse RMN est la suivante : RMN ^1H (DMF_{d_7} , réf TMS,

- 5 330 K) δ : 4.18 (s, 2H), 4.16 (q, 2H, $J=7$ Hz), 1.46 (m, 27H), 1.22 (t, 3H, $J=7$ Hz).

L'analyse du produit 3 par spectrométrie de masse est la suivante : MALDI-TOF $[\text{M}+\text{H}]^+$ calculé : 419.5, trouvé : 441.4 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 457.4 $[\text{M}+\text{K}]^+$.

3) Synthèse de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4

- Le composé 3 (3.0 g, 7.2 mmoles) est traité, à température ambiante, 10 par un mélange constitué de 10,8 ml de soude 1 M et de 10 ml d'éthanol. Le mélange est agité 2h30 à température ambiante. Le milieu réactionnel est ensuite dilué avec 20 ml d'eau, extrait en milieu basique avec 2 x 20 ml d'éther, puis acidifié par ajout d'acide chlorhydrique 1 N. La phase aqueuse est alors extraite avec du dichlorométhane (2 x 20 ml) puis du diéthyl éther (2 x 20 ml). Les phases organiques 15 sont réunies, séchées sur Na_2SO_4 , filtrées et concentrées sous pression réduite. Le mélange résiduel est recristallisé dans un mélange diéthyl éther/heptane (2/3). Le produit obtenu 4 est un solide blanc (1.7 g, 4.4 mmoles, rendement : 61%). Son analyse RMN est la suivante : RMN ^1H (DMF_{d_7} , réf TMS, 330 K) δ : 4.20 (s, 2H), 1.47 (brs, 27H) ; RMN ^{13}C (DMF_{d_7}) 169.7 (C=O), 150.9 (C=O), 85.7 (C quaternaire), 20 51.8 (CH_2), 27.9 (CH_3).

EXEMPLE 2 : Synthèse et purification de l'hydrazinopeptide 6 (figure 2).

- Synthèse de l'hydrazinopeptide 6

Le peptide 5 est élaboré sur une résine Wang (0.73 mmol/g, Applied Biosystems, Foster City, USA), selon la stratégie Fmoc/*tert*-butyl, telle que décrite par exemple par FIELDS *et al.* dans *Int. J. Pept. Protein*, 1990, 35, 161, et une activation HBTU/HOBt (voir SCHNÖLZER *et al* dans *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 40, 180), à l'aide d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A (Foster City, USA). Les protections des chaînes latérales sont : His(Trt), Glu(O'Bu), Arg(Pmc), Lys(Boc). En fin de synthèse, le groupement Fmoc de la fonction $\alpha\text{-NH}_2$ de l'arginine est 25 déplacé en présence de pipéridine 20% dans le DMF. L'acide N,N'-tri(Boc) hydrazinoacétique 4 (1.2 eq) est ensuite introduit manuellement en utilisant l'activation BOP *in situ* (BOP 1.2 eq, DIEA 3.6 eq dans le DMF durant 20 min), comme décrit par exemple par GAIKI *et al.* dans *Tetrahedron Letters*, 1990, 50, 7363. 30 La peptidyl-résine est lavée successivement avec du DMF, du dichlorométhane, puis de l'éther. Elle est ensuite séchée sous pression réduite durant 30 min.

La coupure du lien peptide-résine ainsi que la déprotection des chaînes latérales sont réalisées en présence d'un mélange TFA/H₂O/anisole (1 g de résine sèche/9.5 ml de TFA/0.25 ml d'anisole/0.25 ml d'H₂O) sous agitation durant 2h à température ambiante. Le peptide 6 est précipité dans un mélange Et₂O/heptane (1/1)

- 5 préalablement refroidi à 0° C (200 ml). Le précipité est centrifugé puis dissous dans un mélange H₂O/AcOH (5/1), congelé et lyophilisé.

- Purification de l'hydrazinopeptide 6

L'hydrazinopeptide 6 a été purifié par HPLC sur une colonne C18 hyperprep en utilisant un gradient linéaire de 0% à 50% d'un mélange 10 TFA/eau/isopropanol (rapport eau/isopropanol de 2/3, le mélange comprenant 0,05% de TFA) dans un mélange 0.05% TFA/eau. Un tel éluant permet avantageusement d'éviter toute dégradation du peptide. Le composé purifié est lyophilisé et stocké à -20°C.

~~La pureté du composé purifié est contrôlé par HPLC analytique sur une colonne C18 Vydac en utilisant le même système éluant que précédemment. L'identité du peptide 6 a été vérifiée par analyse ES-MS sur un spectromètre Micromass Quattro ([M+H]⁺ calculé 1432.5, trouvé 1432.7).~~

- Caractérisation de la peptidyl-résine 5

Avant introduction de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique 4, la 20 composition en acide aminé du peptide 5 a été vérifiée par une hydrolyse totale réalisé sur la peptidyl-résine en présence d'un mélange acide chlorhydrique 6N/acide propionique (1/1) et de quelques gouttes de phénol à 140°C durant 3h. Cette hydrolyse est suivie de l'identification sur un analyseur d'acides aminés Beckman, modèle 7300.

EXEMPLE 3 : Synthèse des lipopeptides 11, 12, 13, 14, 16 et 18 (figure 3).

25 1) Synthèse des composés 7, 8, 9, 10, 15 et 17

- Synthèse des composés 7, 8, 9, 15 et 17.

Dans le cas où R (figure 3) représente la chaîne grasse d'un acide oléique, 10 mg (35.4 µmoles) d'acide oléique, 4.08 mg (35.4 µmoles) de N-hydroxysuccinimide et 4.3 µl (27.2 µmoles) de diisopropylcarbodiimide sont 30 dissous dans un mélange THF/dichlorométhane (175 µl / 175 µl). Après une nuit à 0°C, le milieu est concentré sous pression réduite. L'huile résiduelle (composé 8) est reprise dans 6.8 ml de 2-méthyl-propane-2-ol.

On procède de la même manière pour activer les acides palmitique, stéarique, linoléique et cis-9,10-époxystéarique, c'est-à-dire pour obtenir ces acides 35 sous forme d'esters de succinimidyle (obtention des composés 7, 9, 17 et 15).

- Synthèse du composé 10.

500 mg (1.13 mmoles) de chloroformiate de cholestéryle et 140.9 mg (1.22 mmoles) de N-hydroxysuccinimide sont dissous dans 2 ml de dichlorométhane à température ambiante. 170 µL (1.22 mmoles) de triéthylamine sont

ajoutés au milieu réactionnel. La réaction est exothermique et il se forme un précipité blanchâtre. Après 45 min d'agitation à température ambiante, le milieu est dilué avec 50 ml de dichlorométhane et lavé avec une solution de KH_2PO_4 saturée. La phase organique est séchée sur sulfate de sodium, filtrée puis concentrée sous pression réduite. Le composé 10 obtenu est un solide blanc (451.6 mg, 0.85 mmoles, rendement : 76%). Il s'agit d'un carbonate de cholestéryle activé par le N-hydroxysuccinimide.

2) Synthèse du lipopeptide 11

- Protocole.

6 mg (3 µmoles) de l'hydrazinopeptide 6, dont la synthèse a été décrite dans l'exemple 2, sont dissous dans 900 µl d'un tampon phosphate/citrate 0.25 mM, pH=5.2 (160.2 µl d'une solution de Na_2HPO_4 0.2 M et 139.8 µl d'acide citrique 0.1 M complété à 1.2 ml avec de l'eau). Le pH de l'hydrazinopeptide 6 en solution est réajusté si nécessaire avec la solution de Na_2HPO_4 0.2 M. 1.48 mg (3.6 µmoles) de palmitoate de succinimidyle 7 sont dissous dans 900 µl de 2-méthyl-propane-2-ol. Les deux solutions sont ensuite mélangées et agitées à température ambiante durant 72 h.

L'utilisation d'un milieu mixte tampon/2-méthyl-propane-2-ol permet à la fois de contrôler le pH du milieu réactionnel et d'assurer la bonne solubilité de l'hydrazinopeptide 6, de l'acide gras 7 et du lipopeptide final 11. De plus, l'introduction de la partie lipophile sur le peptide se fait dans des conditions douces, autorisant ainsi l'introduction d'acides gras sensibles aux acides forts.

L'avancement de la réaction est suivi par HPLC sur une colonne C3 Zorbax (0 à 100% de solvant B à 0.05% TFA/80% acetonitrile/20% eau en 30 mn puis 5 min à 100% de solvant B, 1 ml/mn, détection à 215 nm). Après 72 h, le suivi par HPLC révèle que la réaction est terminée. Le milieu réactionnel est alors dilué avec 5 ml d'un mélange eau/acide acétique (80/20) et purifié sur une colonne C3 Zorbax en utilisant le système éluant précédent. Après congélation et lyophilisation, le lipopeptide 11 est obtenu avec un rendement de 61% (3.89 mg, 1.83 µmoles). On obtient seulement 6% de lipopeptide diacylé (couplage du groupement palmityle non seulement sur le groupement hydrazine du peptide 6, mais aussi sur la fonction amine située sur la chaîne latérale du résidu lysine dudit peptide).

- Caractérisation du lipopeptide 11.

Le composé purifié est analysé par ES-MS (Micromass Quattro II Electrospray Mass Spectrometer). $[M+H]^+$ calculé : 1672.1, trouvé : 1671.6.

L'analyse RMN TOCSY confirme la structure du produit 11.

- 5 L'échantillon est préparé en dissolvant le lipopeptide 11 dans 500 μ l d'un mélange CD₃CO₂H / H₂O (80/20). La concentration finale du peptide 11 est de 5 mM. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au sel de sodium de l'acide 3-(triméthylsilyl)[2,2,3,3-d₄] propionique, utilisé comme référence interne. L'acquisition du spectre RMN est réalisée sur un Bruker DRX 300 à 300 K.

10 3) Synthèse des lipopeptides 12, 13, 14, 16 et 18

On procède de façon similaire à ce qui a été décrit en 2) pour la synthèse du lipopeptide 11, en faisant réagir l'hydrazinopeptide 6 avec, respectivement, les composés 8, 9, 10, 15 et 17.

~~Seule la purification du lipopeptide 16 varie. Sa purification par~~

- 15 HPLC est réalisée à pH 7.0 sur une colonne C3 Zorbax en utilisant l'éluant suivant : de 100% de solvant A (tampon phosphate 50 mM, pH 7.0) à 100% de solvant B (tampon phosphate 50 mM, pH 7.0, comprenant 50% d'isopropanol) en 100 minutes, à raison de 3 ml/minute et à 50°C, la détection s'effectuant à 215 nm. Le composé 16 ainsi obtenu est ensuite dessalé en utilisant les conditions suivantes : colonne 20 polystyrène-divinylbenzène, gradient de 100% de solvant A (eau comprenant 0,05% de triéthylamine) à 100% de solvant B (mélange eau/acetonitrile 20/80 comprenant 0,05% de triéthylamine) en 10 minutes, à raison de 4 ml/minute et à 50°C, la détection s'effectuant à 215 nm.

La caractérisation des lipopeptides 12, 13, 14, 16 et 18 par ES-MS et 25 les rendements obtenus pour les différents lipopeptides sont les suivants (tableau I) :

Tableau I

lipopeptide	groupe lipophile	$[M+H]^+$ calculé	$[M+H]^+$ trouvé	rendement
<u>12</u>	oléyle	1697.2	1697.8	53%
<u>13</u>	stéaryle	1699.2	1699.5	65%
<u>14</u>	cholestéryle	1845.6	1845.7	56%
<u>16</u>	cis-9,10-époxytéaryle	1713.2	1713.5	53%
<u>18</u>	linoléyle	1695.2	1695.5	51%

On obtient seulement 6, 7 et 8% respectivement de lipopeptides 30 diacylés lors des synthèses des lipopeptides 12, 13 et 14.

EXAMPLE 4 : Synthèse du lipopeptide 13 par hydrogénéation catalytique du lipopeptide 12 (figure 4).

500 µg de palladium sur charbon à 10% en suspension dans 600 µl d'une solution à 20% d'acide acétique concentré dans l'eau sont ajoutés à 5 mg
 5 (2.3 µmoles) du composé 12, obtenu de la façon décrite dans l'exemple précédent, dissous dans 300 µl de la même solution. Après 4 h d'agitation à température ambiante sous atmosphère d'hydrogène, 1.64 mg de palladium sur charbon en suspension dans 100 µl d'acide acétique glacial sont ajoutés au milieu réactionnel. Après 20 h, la conversion est totale et le milieu est filtré sur celite et lavé avec une
 10 solution à 20% d'acide acétique dans l'eau (3 x 3 ml), puis du méthanol (3 x 3 ml). Le filtrat est concentré sous pression réduite, congelé puis lyophilisé. Le composé ainsi obtenu est purifié par HPLC sur une colonne C3 Zorbax en utilisant un gradient linéaire de 0% à 55% d'un mélange eau/acetonitrile/TFA (1/4 en eau/acetonitrile, avec 0,05% de TFA) dans un mélange 0,05% TFA/eau (eau comprenant 0,05% de TFA). Le
 15 composé purifié (2.55 mg, 1.2 mmoles, rendement : 52%) est lyophilisé et stocké à -20%.

La pureté du composé purifié est contrôlée par HPLC analytique sur une colonne C3 Zorbax en utilisant le même système éluant que précédemment. Le composé est identifié par ES-MS : [M+H]⁺ calculé : 1699.2, trouvé : 1699.6.

20 **EXAMPLE 5 : Synthèse du lipopeptide 21 (figure 5).**

1) Synthèse de l'hydrazinopeptide 19.

L'hydrazinopeptide 19 a été synthétisé sur 0,25 mmol (357.1 mg) de résine Rink Amide aminométhyl-polystyrène comprenant 1% de divinylbenzène (0,70 mmol/g, 100-200 Mesh, Senn Chemicals AG) en utilisant la stratégie Fmoc/tert-butyle telle que décrite par exemple par FIELDS *et al.* *Int. J. Pept. Protein*, 1990, 35, 161, et une activation HBTU/HOBt (SCHNÖLZER *et al.*, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1992, 40, 180), à l'aide d'un synthétiseur de peptides Applied Biosystem 431A (Foster City, USA). Les groupements protecteurs Fmoc sont éliminés à l'aide d'une solution de pipéridine. A la fin de la synthèse, le groupement protecteur Fmoc de la fonction
 25 α-NH₂ de la lysine N-terminale est éliminé à l'aide d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF.
 30

La fonction α-NH₂ ainsi déprotégée est modifiée en utilisant la procédure de N-amination électrophile en phase solide mise au point par C. KLINGUER *et al.* (*Tetrahedron Letters*, 1996, 37, 40, 7259-7262).
 35 L'hydrazinopeptide obtenu est déprotégé et coupé de la résine en utilisant 10 ml d'une solution de TFA (94% TFA, 2,5% H₂O, 2,5% thioanisole, 1% triisopropylsilane)

pendant 1h30 sous agitation. Le composé est ensuite précipité dans 100 ml d'une solution Et₂O/pentane 1/1. Après précipitation et élimination du surnageant, le culot est dissous dans de l'acide acétique à 10%, congelé est lyophilisé.

L'identité de l'hydrazinopeptide 19 est vérifiée par PDMS-TOF sur un Spectromètre de Masse à Désorption de Plasma Bio-ion 20. [M+H]⁺ calculé : 895.5, observé : 895.9.

La purification de l'hydrazinopeptide 19 est réalisée sur une colonne préparative C3 Zorbax (30°C, détection à 235 nm, tampon A = H₂O 100%/TFA 0,05%, tampon B = alcool isopropyle 40%/H₂O 60%/TFA 0,05%, débit de 10 2 ml/minute, de 0 à 70% en B en 70 minutes). Après congélation et lyophilisation, l'hydrazinopeptide 19 est obtenu avec un rendement de 56%. La pureté du produit après lyophilisation est vérifiée par RP-HPLC dans les mêmes conditions qu'indiquées précédemment.

2) Synthèse du lipopeptide 21.

15 5.06 mg d'hydrazinopeptide 19 sont dissous dans 791 µl de tampon citrate-phosphate pH 5.11. 1.1 eq. (4,12 µmol) de palmitate de succinimidyle 20 (Su représentant un groupe succinimidyle) dissous dans 791 µl de 'BuOH sont alors ajoutés. Le suivi de la réaction est réalisé par RP-HPLC sur une colonne C3 Zorbax. Après 48 h, le milieu réactionnel est purifié sur colonne préparative C3 Zorbax (30°C, 20 détection à 215 nm, tampon A = H₂O 100%/TFA 0,05%, tampon B = acetonitrile 80%/H₂O 20%/TFA 0,05%, débit de 3 ml/minute, de 0 à 70% en B en 70 minutes). Le rendement en lipopeptide 21 est de 60%.

EXAMPLE 6 : Synthèse des lipopeptides 23 et 24 (figure 6).

1) Synthèse de l'hydrazinopeptide 22.

- 25 • Protocole de synthèse.

Le peptide 22 est élaboré sur une résine Fmoc-PAL-PEG-PS (0,16 mmol/g, Perseptive) selon la stratégie Fmoc/*tert*-butyle et une activation HBTU/HOBt (voir l'exemple 2) sur un synthétiseur de peptides Pioneer-Perseptive. Les protections des chaînes latérales des acides aminés sont les suivantes : His(Trt), 30 Asn (Trt), Glu(O'Bu), Arg(Pbf), Lys(Boc), Ser('Bu). En fin de synthèse, le groupement Fmoc de la fonction α-NH₂ de lalanine est éliminé en présence de pipéridine à 20% dans le DMF. L'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique (1,2 eq.) est ensuite introduit manuellement en utilisant l'activation BOP *in situ* (BOP : 1,2 eq., DIEA : 3,6 eq. dans le DMF durant 20 minutes). La peptidyl-résine est lavée successivement avec du 35 DMF, du dichlorométhane, puis de l'éther. Elle est ensuite séchée sous pression réduite pendant 30 minutes. La coupure du lien peptide-résine ainsi que la

déprotection des chaînes latérales sont réalisées en présence d'un mélange TFA/phénol/éthanedithiol/thioanisole/H₂O (1 g de résine sèche / 10 ml de TFA / 0,25 ml d'éthanedithiol / 0,25 ml d'H₂O / 0,25 ml de thioanisole / 0,75 g de phénol) sous agitation durant 3h30 à température ambiante. Le peptide est précipité dans

- 5 200 ml d'un mélange Et₂O/heptane (1/1) préalablement refroidi à 0°C. Le précipité est centrifugé puis dissous dans un mélange H₂O/AcOH (5/1), congelé et lyophilisé. On obtient 263 mg de peptide brut à partir de 0,072 mmole de résine.

- Purification de l'hydrazinopeptide 22.

- L'hydrazinopeptide 22 a été purifié par HPLC sur une colonne C3
 10 Zorbax en utilisant un gradient linéaire de 0% à 50% en 70 minutes d'un mélange 0,05% TFA/eau/isopropanol (2/3) dans un mélange 0,05% TFA/eau. Le composé purifié (43 mg) est lyophilisé et stocké à -20°C. L'analyse de l'hydrazinopeptide 22 par ES-MS est la suivante : [M+H]⁺ calculé : 4645.5, trouvé : 4645.7.

2) Synthèse des lipopeptides 23 et 24.

- 15 Les composés 7 et 10 sont préparés comme indiqué dans l'exemple
 3. Les lipopeptides 23 et 24 sont obtenus, respectivement à partir des composés 7 et 10 et de l'hydrazinopeptide 22, selon la mode opératoire décrit précédemment pour la synthèse du lipopeptide 11. Ils ont été obtenus avec un rendement de 40% après purification.

- 20 L'analyse par ES-MS (Micromass Quattro II Electrospray Mass Spectrometer) donne les résultats suivants :

lipopeptide 23 : [M+H]⁺ calculé : 4883.5, trouvé : 4883.7 ;

lipopeptide 24 : [M+H]⁺ calculé : 5058.5, trouvé : 5059.0.

- Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite
 25 nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

REVENDICATIONS

- 1°) Procédé de couplage entre un peptide et au moins un composé A, de nature non peptidique, portant une fonction sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool, caractérisé en ce que ledit couplage comprend au moins une étape de réalisation, en phase homogène, d'un lien hydrazide entre ledit peptide et ledit composé A.
- 2°) Procédé de couplage selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend, pour réaliser ledit lien hydrazide, les étapes suivantes :
- 10 a) activation de la fonction portée par ledit composé A en une fonction réactive correspondante, respectivement sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions esters et les fonctions carbonate, lorsque le composé A porte respectivement une fonction acide carboxylique et une fonction alcool ; et
- b) réaction, en phase homogène et à un pH inférieur à 6, entre ledit
- 15 composé A activé obtenu en a) et un peptide, totalement déprotégé, portant un groupement hydrazine ou dérivé d'hydrazine soit au niveau de son extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.
- 3°) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, une étape c) de purification du peptide modifié obtenu à l'étape b).
- 20 4°) Procédé selon la revendication 2 ou la revendication 3, caractérisé en ce que, après l'étape a) d'activation de la fonction portée par le composé A, la fonction réactive correspondante portée par le composé A est sélectionnée dans le groupe constitué par les esters et les carbonates de succinimidyle, de sulfosuccinimidyle et d'aryle.
- 25 5°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que ledit groupement dérivé d'hydrazine portée par le peptide est un groupement α -hydrazinoacétique.
- 30 6°) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que, préalablement à l'étape b), ledit peptide est fonctionnalisé par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de son extrémité N-terminale, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique, à l'aide de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique.
- 35

7°) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que la fonctionnalisation dudit peptide par un groupement α -hydrazinoacétique est suivie d'une étape de purification dudit peptide fonctionnalisé par chromatographie liquide haute performance, à l'aide d'un éluant constitué d'un mélange eau/alcool, de préférence un mélange eau/isopropanol, comprenant de l'acide trifluoroacétique.

8°) Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ledit composé A est sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdits 10 lipides sont sélectionnés dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols.

10°) Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que lesdits 15 lipides sont sélectionnés dans le groupe constitué par l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide cis-9,10-époxystéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

11°) Peptide modifié, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé A portant, avant sa liaison audit peptide, une fonction sélectionnée dans le groupe constitué par les fonctions acide carboxylique et les fonctions alcool.

20 12°) Peptide modifié selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il est essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un composé sélectionné dans le groupe constitué par les lipides, les sucres, les alcools et les marqueurs de fluorescence.

25 13°) Peptide modifié selon la revendication 12, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un oligopeptide essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide sélectionné dans le groupe constitué par les acides gras saturés, les acides gras insaturés et les stérols.

30 14°) Peptide modifié selon la revendication 13, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un oligopeptide essentiellement constitué d'un peptide lié, par un lien hydrazide, à au moins un lipide sélectionné dans le groupe constitué par l'acide palmitique, l'acide stéarique, l'acide cis-9,10-époxystéarique, l'acide oléique, l'acide linoléique et le cholestérol.

35 15°) Vaccin synthétique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un peptide modifié selon l'une quelconque des revendications 11 à 14.

16°) Réactif de diagnostic, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un peptide modifié selon l'une quelconque des revendications 11 à 14.

17°) Utilisation du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 pour la préparation d'un médicament comprenant un principe actif de nature peptidique vectorisé, utile pour le ciblage cellulaire.

- 18°) Utilisation de l'acide N,N'-tri(Boc)hydrazinoacétique pour fonctionnaliser un peptide par un groupement α -hydrazinoacétique, soit au niveau de l'extrémité N-terminale dudit peptide, soit au niveau de l'extrémité de la chaîne latérale d'une lysine ou d'une ornithine éventuellement présente à un endroit quelconque de la séquence peptidique.
-

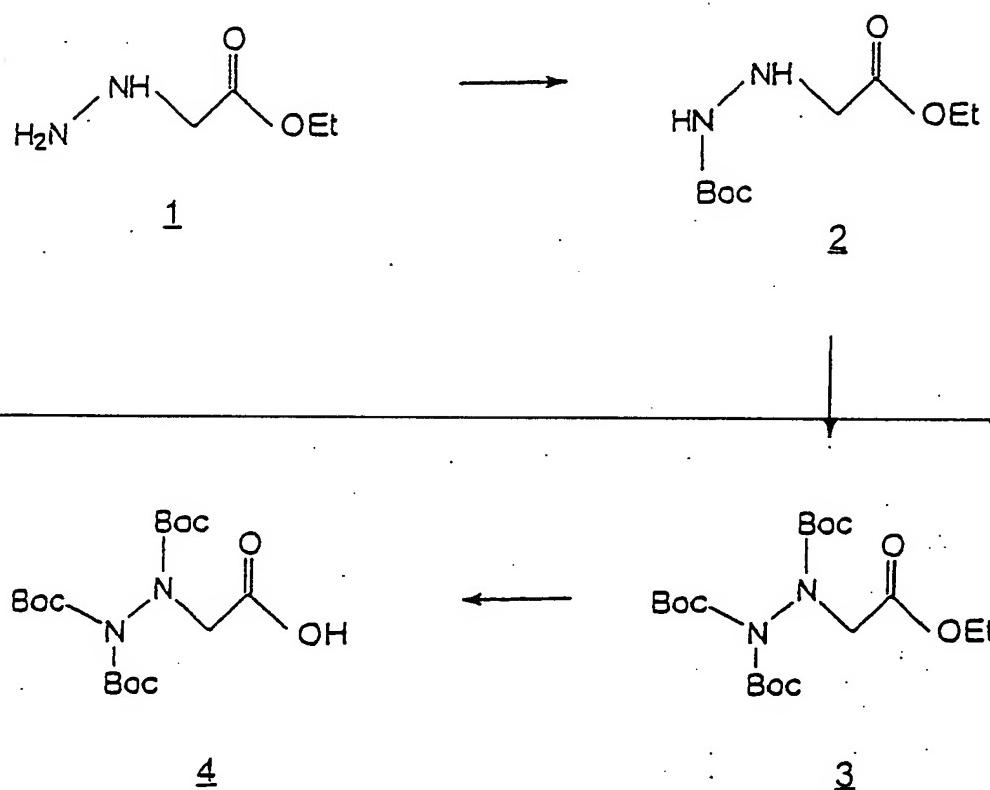
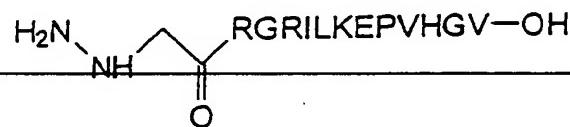


FIGURE 1



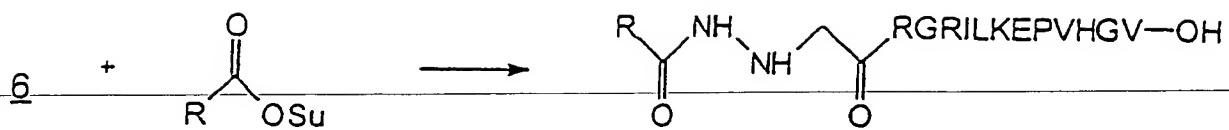
5

support solide



6

FIGURE 2



R =

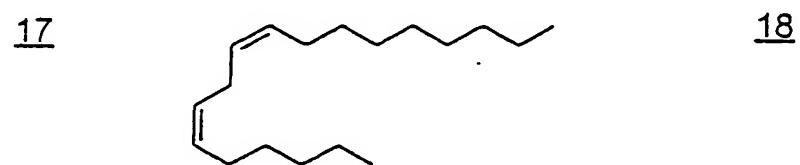
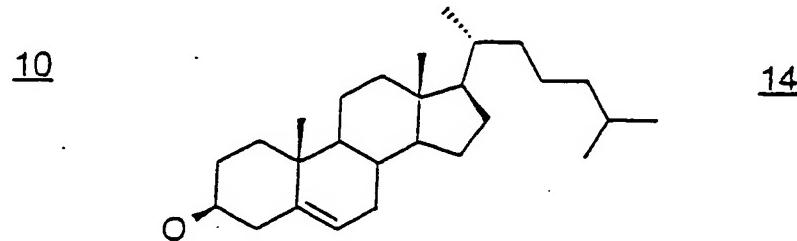
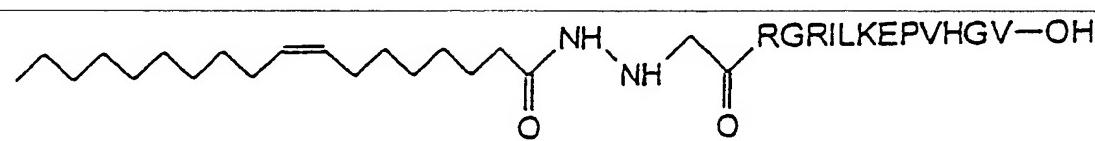
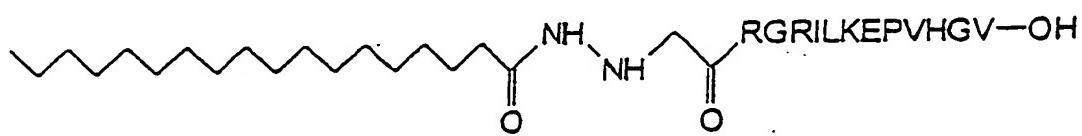


FIGURE 3



12



13

FIGURE 4

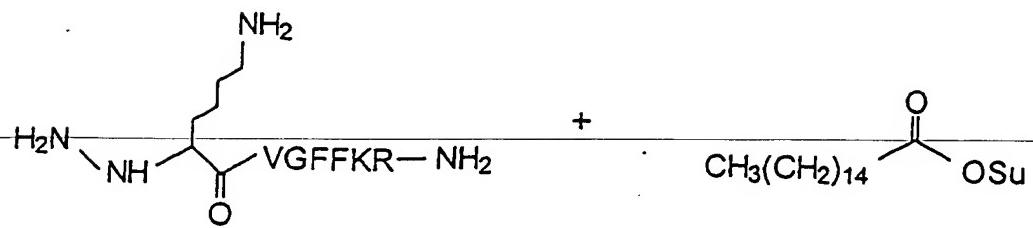
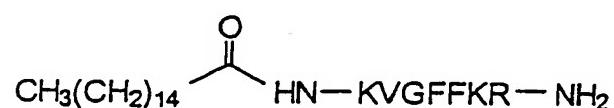
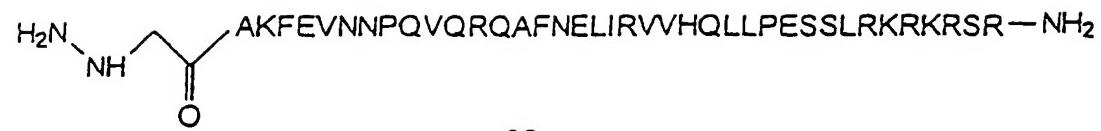
192021

FIGURE 5

22

+

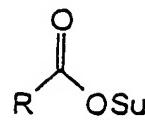
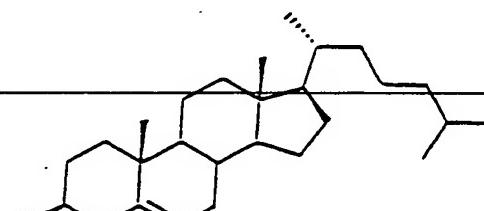
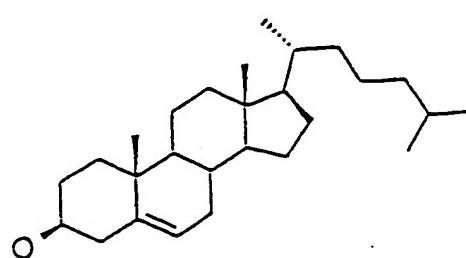
 $R = \text{~~~~~}$ 7 $R = \text{~~~~~}$ 10 $R = \text{~~~~~}$ 23 $R = \text{~~~~~}$ 24

FIGURE 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)